

PCT/JP98/04269

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

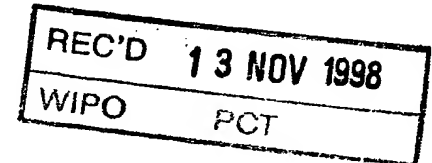
29.09.98

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1997年 9月22日



出 願 番 号
Application Number:

平成 9年特許願第275302号

出 願 人
Applicant (s):

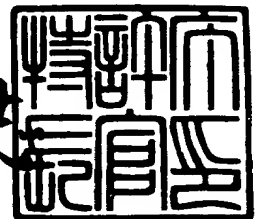
宮田 敏男
黒川 清

PRIORITY DOCUMENT

1998年10月30日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

伴 佐 山 建 志



出証番号 出証特平10-3086789

【書類名】 特許願
【整理番号】 Y1-902
【提出日】 平成 9年 9月22日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 15/00
【発明の名称】 メグシンタンパク質
【請求項の数】 11
【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県小田原市城山 3-3-1

【氏名】 宮田 敏男

【特許出願人】

【郵便番号】 250

【住所又は居所】 神奈川県小田原市城山 3-3-1

【氏名又は名称】 宮田 敏男

【特許出願人】

【郵便番号】 162

【住所又は居所】 東京都新宿区市谷柳町 4 9 市ヶ谷ヒルズ 4 0 1

【氏名又は名称】 黒川 清

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】	明細書	1
【物件名】	図面	1
【物件名】	要約書	1
【物件名】	委任状	2
【物件名】	受託証の写し	2

【書類名】 明細書

【発明の名称】 メグシンタンパク質

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号：2に記載のアミノ酸配列、または該アミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、若しくは付加したアミノ酸配列を有するタンパク質。

【請求項2】 請求項1に記載のタンパク質をコードするDNA。

【請求項3】 配列番号：1に記載の塩基配列を有する請求項2記載のDNA。

【請求項4】 請求項2に記載のDNAを含むことを特徴とするベクター。

【請求項5】 請求項2に記載のDNAを発現可能に保持する形質転換細胞。

【請求項6】 請求項5に記載の形質転換細胞を培養し、請求項2に記載のDNAの発現産物を回収することを特徴とする、請求項1に記載のタンパク質の製造方法。

【請求項7】 請求項1に記載のタンパク質に結合することを特徴とする抗体。

【請求項8】 請求項1に記載のタンパク質をコードする遺伝子の発現を制御するDNA領域。

【請求項9】 ~~プロモーター領域である、請求項8に記載のDNA領域。~~

【請求項10】 エンハンサー領域である、請求項8に記載のDNA領域。

【請求項11】 請求項7に記載のDNA領域に結合する転写因子。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、遺伝子工学の分野に属し、特に腎細胞の遺伝子の単離に関する。

【0002】

【従来の技術】

体内の60兆個もの様々な細胞が、本質的に同一のゲノムDNAを有している。正

常な生理学的機能のために、これらの遺伝子の発現は、細胞系統、および細胞が受容するシグナルにより厳密に制御されている。従って、個々の細胞型で特異的に発現している遺伝子を解明することは極めて重要である。

【0003】

メサンギウム細胞は、腎糸球体の構造および機能の維持に中心的な役割を果たしている。そして、メサンギウム細胞は、各種腎炎において障害の標的となっている。例えば、メサンギウム細胞の増殖、および細胞外の糸球体間質マトリックスの蓄積は、慢性腎炎および糖尿病性腎症のような様々な糸球体疾患の患者に糸球体硬化症をもたらす最初の過程とされている。従って、メサンギウム細胞で特異的に発現している遺伝子を見だしその機能を明らかにすることは、メサンギウム細胞の生物学的性質の解明、メサンギウム細胞に関連する疾患の原因の究明、ひいては、メサンギウム細胞に関連する疾病の治療、診断等に有効であることは疑いを容れない。

【0004】

メサンギウム細胞のマーカーとなるものとしては、ラットではThy1抗原が知られているが、この遺伝子はメサンギウム細胞特異的ではない。ヒトではメサンギウム細胞には発現していない (Miyata T. et al., Immunology(1989); 67: 531-533; Miyata T. et al., Immunology(1990); 69: 391-395)。一方、メサンギウム細胞は活性化されると α 平滑筋アクチンを発現することが知られているが、この遺伝子もメサンギウム細胞特異的ではない。このように、メサンギウム細胞で特異的に発現される遺伝子については、従来報告がなかった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、メサンギウム細胞で特異的に発現される遺伝子を単離することを課題とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、ヒトメサンギウム細胞のインビトロ培養物からmRNAを単離し、3'側のcDNAライブラリーを作成した。そして、該cDNAライブラリーの中からラン

ダムに多数のクローンの配列を決定し、該塩基配列を、種々の臓器及び細胞から得られた既知の3'側のcDNAクローンの塩基配列と比較することによって、メサングウム細胞で特異的に発現しているクローンを選択した。そのうち、メサングウム細胞において最も出現頻度の高い1クローンを選択し、5' RACE法によって完全長cDNAを単離し（発現産物をヒト「MEGSIN」と命名）、全塩基配列を決定し、該cDNAを大腸菌で発現させた（ヒト「MEGSIN」cDNAの塩基配列を配列番号：1に、ヒト「MEGSIN」の推定アミノ酸配列を配列番号：2に示す）。そして、SwissProtデータベースのアミノ酸配列とホモロジー検索を行い、「MEGSIN」がSERPINスーパーファミリー [R. Carrell et al., Trends Biochem. Sci. 10, 20 (1985); R. Carrell et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 52, 527 (1987); E. K. O. Kruthof et al., Blood 86, 4007 (1995); J. Potempa et al., J. Biol. Chem. 269, 15957 (1994); E. Remold-O'Donnell, FEBS Lett. 315, 105 (1993)] に属することを見いだした。更に、ノザンブロットティングにより組織分布をみたところ、「MEGSIN」は、ヒト繊維芽細胞、平滑筋細胞、内皮細胞、ケラチノサイトでは検出されず、メサングウム細胞特異的に発現していることが確認された。また、IgA腎症患者と健常人とで腎臓組織中の「MEGSIN」の発現量を比較したところ、IgA腎症患者において「MEGSIN」が有意に発現量が多いことを見いだした。更に、抗「MEGSIN」ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を作成した。

【0007】

即ち、本発明は具体的には以下のものを含む。

- (1) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列、または該アミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、若しくは付加したアミノ酸配列を有するタンパク質。
- (2) (1)に記載のタンパク質をコードするDNA。
- (3) 配列番号：1に記載の塩基配列を有する(2)に記載のDNA。
- (4) (2)に記載のDNAを含むことを特徴とするベクター。
- (5) (2)に記載のDNAを発現可能に保持する形質転換細胞。
- (6) (5)に記載の形質転換細胞を培養し、(2)に記載のDNAの発現産物

を回収することを特徴とする、(1)に記載のタンパク質の製造方法。

(7) 請求項1に記載のタンパク質に結合することを特徴とする抗体。

(8) 請求項1に記載のタンパク質をコードする遺伝子の発現を制御するDNA領域。

(9) プロモーター領域である、(8)に記載のDNA領域。

(10) エンハンサー領域である、(8)に記載のDNA領域。

(11) (7)に記載のDNA領域に結合する転写因子。

【0008】

なお、全長cDNAライブラリーでは、mRNAの部分分解または不完全な第1鎖合成のために、同じ転写産物のcDNAの5'-末端が異なる配列を有することが多い。さらに、その3'-末端のヌクレオチド配列は、poly(A)におけるプライマー伸長のずれにより、一般的なプライマーを用いたチェーンターミネーション法で決定することが困難である。ESTデータベースを構築するために用いられているランダムプライムcDNAライブラリーは、新規な遺伝子を見つけだすのに有用である。しかし、2つの部分配列が一つの遺伝子の異なる部分を形成しているのか、異なる転写産物を形成しているのかが明らかでないため、遺伝子の特徴配列を得るために用いることはできない。従って、本発明者らは、3'-方向領域cDNAライブラリーを用いた。この方法により、cDNAの大きさを反映するクローニング効率の変動を回避することができる。3'領域の配列は特異的なものであり、約200~300bpの配列データは、遺伝子の特徴を明らかにするのに充分である。

【0009】

【発明の実施の形態】

本発明の「MEGSIN」をコードするDNAは、メサングウム細胞からmRNAを調製した後、既知の方法により二本鎖cDNAに変換することにより得ることができる。mRNAの調製はグアニジンイソチオシアネート-塩化セシウム法 [Chirwin, et al. Biochemistry 18, 5294 (1979)]、デオキシリボヌクレアーゼ存在下に界面活性剤処理、フェノール処理を行なう方法 [Berger & Birkenmeier, Biochemistry 18, 5143 (1979)] などを用いることができる。全RNAからのpoly(A)⁺RNAの調製はオリゴ(dT)を結合した担体、例えばセファロース、セルロースやラテックス粒

子等を用いたアフィニティークロマトグラフィーなどを用いて行なうことができる。上記のごとくして得たRNAを鋳型として、3'端にあるpoly(A)鎖に相補的なオリゴ(dT)またはランダムプライマーあるいは「MEGSIN」のアミノ酸配列の一部に相応する合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして逆転写酵素で処理し、このようにして得られたmRNAに相補的なDNA(cDNA)からなるハイブリッドのmRNA鎖を例えばE. Coli RNase H、E. Coli DNA polymerase I、E. Coli DNA Ligaseで処理し、DNA鎖に置換することにより、二本鎖cDNAを得ることができる。

【0010】

ヒト「MEGSIN」遺伝子塩基配列をもとに合成したプライマーを用いて、メサンギウム細胞poly(A)⁺RNAを鋳形にしてRT-PCR法によりクローニングすることも可能である。また、PCRによらず、ヒト「MEGSIN」遺伝子塩基配列をもとにプローブを合成し、直接cDNAライブラリーをスクリーニングし、目的とするcDNAを得ることもできる。本発明の遺伝子は、これらの方法により得られた遺伝子の中から、その遺伝子の塩基配列を確認することにより、選択することができる。

【0011】

ヒト「MEGSIN」ゲノムは、ヒトBリンパ芽球からゲノムを調製し、Sau3で部分的に切断したDNAをファージベクターであるEMBL3に、もしくは、ヒトX染色体ライブラリーをファージベクターであるCharon35に組み込んだゲノミックライブラリー(Blood, vol 83, No 11, 1994: pp3126-3131、参照)を用いることにより、既に分かっている「MEGSIN」cDNAのオープンリーディングフレーム全ての領域(1143bp)またはcDNA部分をプライマーとしてヒトゲノムDNAをPCR法を用いて増幅することにより得られた各エキソン-イントロン部分をプローブとすることによりブランクハイブリダイゼーション法(新細胞工学実験プロトコール、秀潤社、pp79-92、参照)を行い取得できる。また、同時に調節領域に関しても、ヒト培養メサンギウム細胞由来mRNA、もしくはヒト腎臓mRNA(Clontech社より購入)を鋳型として、5' RACE法(5'-Full RACE Core Set(宝酒造(株)の方法に従う))を用いて5' UT領域の配列決定を行うことができる。

【0012】

本発明の遺伝子は、例えばホスホアミダイド法[Mattencchi, M.D. & Caruthers

、M. H. J. Am. Chem. Soc. 103, 3185(1981)]、ホスファイト・トリエステル法 [Hunkapiller, M. et al. Nature 310, 105 (1984)] 等の核酸の化学合成を用いる常法に従って製造することもできる。

【0013】

なお、一般に、真核生物の遺伝子はヒトインターフェロン遺伝子で知られているように多形現象を示すことが多く、この多形現象によって1個あるいはそれ以上のアミノ酸が置換される場合もあるが、通常蛋白質の活性は維持される。また、一般に、1個または数個のアミノ酸配列の改変によって、蛋白質の活性が維持される場合が多いことが知られている。従って、配列番号：2に示されるアミノ酸配列をコードする遺伝子を人工的に改変したものを用いて得られたタンパク質をコードする遺伝子は、該タンパク質が本発明の遺伝子の特徴的な機能を有する限り、すべて本発明に含まれる。また、配列番号：2に示されるアミノ酸配列を人工的に改変したタンパク質は、本発明のタンパク質の特徴を有する限り、すべて本発明に含まれる。

【0014】

即ち、本発明のタンパク質には、配列番号：2に記載のアミノ酸配列、または該アミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、若しくは付加したアミノ酸配列を有し、SERPINスーパーファミリーに属するタンパク質が含まれる。ここで、SERPINスーパーファミリーとは、アンチトロンビンIII、ヘパリンコファクターII、 α_1 -アンチトリプシン、 α_1 -アンチキモトリプシン、プロテインCインヒビター、 α_2 -プラスミンインヒビター、C1インヒビターなど、血中の主要なセリンプロテアーゼインヒビターとアミノ酸配列が相互に少なくとも20%同一であるものをいい、必ずしもセリンプロテアーゼ阻害活性を示す必要はない。[R. Carrell et al., Trends Biochem. Sci. 10, 20 (1985); R. Carrell et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 52, 527 (1987); E. K. O. Kruithof et al., Blood 86, 4007 (1995); J. Potempa et al., J. Biol. Chem. 269, 15957 (1994); E. Remold-O'Donnell. FEBS Let. 315, 105 (1993) 参照]

更に、本発明のタンパク質には「配列番号：2に記載のアミノ酸配列、または

該アミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、若しくは付加したアミノ酸配列を有し、ヒト繊維芽細胞、平滑筋細胞、内皮細胞、ケラチノサイトでは検出されず、メサングウム細胞で発現しているタンパク質」、「配列番号：2に記載のアミノ酸配列、または該アミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、若しくは付加したアミノ酸配列を有し、哺乳類メサングウム細胞で特に強く発現しているタンパク質」または「配列番号：2に記載のアミノ酸配列、または該アミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、若しくは付加したアミノ酸配列を有し、セリンプロテアーゼ阻害活性を有するタンパク質」などが含まれる。

【0015】

また、本発明のDNAには、これらのタンパク質をコードするDNAが含まれる。

【0016】

また、所望のアミノ酸に対するコドンはそれ自体公知であり、その選択も任意でよく、例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従い決定できる[Grantham, R. et al. Nucleic Acids Res. 9, r43 (1981)]。従って、コドンの縮重を考慮して、DNAを適宜改変したものもまた本発明のDNAに含まれる。さらに、これら核酸配列のコドンの一部改変は、常法に従い、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用した部位特異的変位導入法(sitespecific mutagenesis) [Mark, D.F. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81,5662 (1984)] 等に従うことができる。

【0017】

マウス、ラット「MEGSIN」cDNAは、すでに分かっているヒト「MEGSIN」cDNAより他のSERPINスーパーファミリーに属するものと比較的高い領域(197-380A.A.)、保存度が低い領域(1-196A.A.)、「MEGSIN」ORF全長cDNA(1-380A.A.)の三種類のプローブを用いて、マウス、ラットの組織、培養メサングウム細胞からmRNAを抽出しcDNAライブラリーを作成することにより、または、市販cDNAライブラリー(フナコシ)を用いることによりコロニーハイブリダイゼーションを行うことによって取得することができる。また、同時に、前述プローブ作成と

同様に比較的保存度の高い領域(197-380A.A.)、保存度が低い領域(1-196A.A.)でプライマーを作製し、マウス、ラットの組織、培養メサンギウム細胞から抽出したmRNAからRT-PCR法を用いてクローニングを行うことによりマウス、ラット「MEGSIN」cDNAを取得することができる。また、ゲノムの取得に関しても市販ライブラリー(フナコシ)を用いてヒトの場合と同様の方法でブランクハイブリダイゼーション法を行うことにより取得することができる。

【0018】

このようにしてクローン化された「MEGSIN」をコードする遺伝子は適当な発現ベクターDNAに組み込むことにより、他の原核細胞または真核細胞の宿主を形質転換させることができる。さらに、これらの発現ベクターに適当なプロモーターおよび形質発現に係る配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞において遺伝子を発現することが可能である。発現ベクターとしては、例えば大腸菌の場合は、pET-3 [Studier & Moffatt, J. Mol. Biol. 189, 113(1986)] 等が、COS細胞の場合はpEF-BOS [Nucleic Acids Research 18,5322 (1990)]、pSV2-gpt [Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A. 78, 2072 (1981)] 等が、CHO細胞の場合はpVY1 [国際公開第89/03874号公報] 等がそれぞれ挙げられる。また、目的とする遺伝子に他のポリペプチドをコードする遺伝子を連結して融合蛋白質として発現させることにより、精製を容易にし、その後目的蛋白質を切り出すことも可能である。

【0019】

本発明の発現系に用いる宿主のうち原核生物宿主細胞としては、例えば、大腸菌 (*Escherichia coli*) が挙げられる。また真核生物のうち、真核微生物の宿主細胞としては、例えばサッカロミセス・セレビシェー (*Saccharomyces cerevisiae*) 等が挙げられ、哺乳動物由来の宿主細胞としては、例えばCOS細胞、CHO細胞、BHK細胞等が挙げられる。なお、本発明の形質転換体の培養は、宿主細胞に適した培養条件を適宜選択して行なえばよい。

【0020】

以上のようにして目的とする「MEGSIN」をコードする遺伝子で形質転換した形質転換体を培養し、産生された「MEGSIN」は、細胞内または細胞外から分離し均

一にまで精製することができる。なお、本発明の目的蛋白質である「MEGSIN」の分離、精製は、通常の蛋白質で用いられる分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば各種クロマトグラフィー等を適宜選択し、組み合わせれば、「MEGSIN」は分離、精製することができる。

【0021】

なお、上述の他、本発明の遺伝子、該遺伝子を含有する組換えベクター、該ベクターによる形質転換体および該遺伝子を用いた「MEGSIN」の製造過程における遺伝子操作の処理手段は、「Molecular Cloning-A Laboratory Manual」(Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.) に記載の常法に従って行うことができる。

【0022】

本発明の抗体には、例えば、配列番号：2記載のアミノ酸配列を有するタンパク質に対する抗体が含まれる。「MEGSIN」または本発明の「MEGSIN」の部分ペプチドに対する抗体（例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体）または抗血清は、本発明の「MEGSIN」または本発明の「MEGSIN」の部分ペプチドを抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。例えば、モノクローナル抗体は、後述の方法に従って製造することができる。

【0023】

本発明の「MEGSIN」または本発明の「MEGSIN」の部分ペプチドは、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体又は担体、希釈剤と共に投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常1～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えばサル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば後記の標識化「MEGSIN」と抗血清とを反応させた後、抗体に結合した標識剤

の活性を測定することによりなされる。融合操作は既知の方法、例えばケーラーとミルスタインの方法 (Nature, 256, 495 (1975)) に従い実施できる。融合促進剤としてはポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウイルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

【0024】

骨髓腫細胞としては例えばX-63Ag8、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などが挙げられるが、X-63Ag8が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1:20~20:1であり、PEG（好ましくはPEG1000~PEG6000）が10~80%程度の濃度で添加され、20~40℃、好ましくは30~37℃で1~10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

抗「MEGSIN」抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば「MEGSIN」抗原を直接又は担体と共に吸着させた固相（例えば、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合した抗「MEGSIN」モノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体又はプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識した「MEGSIN」を加え、固相に結合した抗「MEGSIN」モノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

【0025】

抗「MEGSIN」モノクローナル抗体の選別およびクローニングは、自体公知またはそれに準じる方法に従って行うことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行われる。選別、クローニングおよび育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いてもよい。例えば、1~20%、好ましくは10~20%の牛胎児血清を含むRPMI1640培地（大日本製薬（株））、1~10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））、またはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20~40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日~3週間、好ましくは1週間~2週間

である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行われる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗「MEGSIN」抗体価の測定と同様にして測定できる。クローニングは、通常半固体アッガー法や限界希釈法などのそれ自体公知の方法で行うことができ、クローン化されたハイブリドーマは、好ましくは無血清培地中で培養され、至適量の抗体をその上清に与える。目的のモノクローナル抗体は好ましくは腹水化して得ることもできる。

【0026】

抗「MEGSIN」モノクローナル抗体の分離精製は通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法（例えば、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例えばDEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲル濾過法、抗原結合固相またはプロテインAまたはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法）に従って行われる。

【0027】

更に本発明の「遺伝子の発現を制御するDNA領域」には、ゲノム中に存在する「MEGSIN」遺伝子のプロモーター領域、エンハンサー領域が含まれる。これらの領域は、特開平6-181767号公報、「The Journal of Immunology(1995)155,2477-2486, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995),92,3561-3565」等と同様の方法で取得することができる。なお、本明細書において、プロモーター領域とは転写開始部位の上流に存在する遺伝子の発現を制御するDNA領域を、エンハンサー領域とはイントロンまたは3'非翻訳領域に存在する遺伝子の発現を制御するDNA領域をいう。

【0028】

具体的には、プロモーター領域は、例えば、以下の方法によって取得することができる。

- 1) 「MEGSIN」cDNAの5'末端側をプローブとし、ヒトゲノムライブラリーより「MEGSIN」のプロモーター領域をクローニングする。
- 2) 制限酵素消化して「MEGSIN」遺伝子の翻訳開始コドンを含むその上流部分（2～5 k b p）のプロモーター領域を含むDNAを得、塩基配列を決定する。ヒト

メサンギウム細胞から調製したpoly(A)⁺RNAを鋳型とし、「MEGSIN」遺伝子の5'末端側cDNA配列より選択したプライマーDNAを用いたプライマー伸長法により、転写開始点(+1)を決定する。塩基配列から転写因子結合配列を検索し、プロモーター活性を有する可能性がある箇所を予想する。

3) 2) で得たDNAから「MEGSIN」遺伝子のコード領域を除いたDNA断片をプラスミド上にサブクローニングし、この2~5 k b p DNA断片の下流に、レポーター遺伝子としてのクロラムフェニコールアセチル転位酵素(CAT)遺伝子、あるいは、ルシフェラーゼ遺伝子を連結したレポータープラスミドを構築する。同様に、プロモーター領域の可能性のある各箇所を含むような形で、制限酵素消化により、或いは、PCRにより、5'末端側及び3'末端側を順次削った「MEGSIN」遺伝子上流部分の様々な部位に該当するDNA断片を作成し、これらの下流に、レポーター遺伝子としてのCAT遺伝子、あるいは、ルシフェラーゼ遺伝子を連結したレポータープラスミドを構築する。

4) 3) で作製したレポータープラスミドで形質転換した動物細胞のCAT或いはルシフェラーゼ活性を測定することにより、「MEGSIN」遺伝子上流部分に存在するプロモーター領域を得る。

【0029】

また、3'非コード領域、イントロン中のエンハンサー領域は、「MEGSIN」cDNAをプローブとし、ヒトゲノムライブラリーよりヒト「MEGSIN」のゲノム遺伝子をクローニングし、上述のプロモーターに関する方法と同様にして、エンハンサー活性を有する領域を得ることができる。

【0030】

「MEGSIN」遺伝子の発現を制御している転写因子は、「新細胞工学実験プロトコル(秀潤社)」、「バイオマニュアルシリーズ5 転写因子研究法(羊土社)」、「DNA & Cell Biology, 13, 731-742 (1994)」に記載の方法等の公知の方法、例えば、アフィニティーカラムを用いた方法、サウスウエスタン法、フットプリンティング法、ゲルシフト法、またはone-hybrid法で得ることができる。なお、本明細書において、転写因子とは「MEGSIN」遺伝子の転写を調節している因子で、転写の開始反応を誘導する転写開始因子と、転写を正または負に調節する転

写調節因子をさす。アフィニティーカラム法を用いる場合は、前述の方法で得た、プロモーター領域、エンハンサー領域をセファローズ或いはラテックスビーズに固定化したカラムに、核抽出液をかけ、カラムを洗浄後、カラムに固定化した配列と同様の配列を有するDNAを用い、結合した転写因子を溶出することによって、「MEGSIN」遺伝子の発現を制御している転写因子を得ることができる。

【0031】

また、サウスウエスタン法を用いる場合は、大腸菌の発現ベクター、例えばλgt11にcDNAを挿入し、β-ガラクトシダーゼとの融合蛋白質を合成させ、ニトロセルロース膜に該融合蛋白質を吸着させて、放射性同位元素で標識されたプロモーター領域、エンハンサー領域のDNA断片をプローブにし、結合活性をもつ融合蛋白質を合成するファージを選択することによって、「MEGSIN」遺伝子の発現を制御している転写因子を得ることができる。

【0032】

【実施例】

以下本発明を実施例として更に具体的に説明するが、本発明は該実施例に限定されるものではない。

【0033】

【実施例1】ヒトメサンギウム細胞の初代培養

58才の男性から摘出した正常なヒト腎臓から、ヒト糸球体腎臓メサンギウム細胞を単離した。腎皮質を、無菌条件下で分離し、細分化し、いくつかの篩を通過させた。用いる篩は、段階的に孔径を小さくしていった。75~200μmの孔径の篩に捕捉された糸球体を、洗浄し、100μg/mlのコラゲナーゼ (Washington Biochemical社製) と共に37℃で20分間インキュベートした。洗浄後、糸球体を、25mM Hepes、10% Nu-serum (Collaborative Biomedical Products社, Bedford, MA) および抗生物質 (10mg/mlのペニシリン、ストレプトマイシン、およびフンギゾン) を含む培地199 (Gibco BRL社, Gaithersburg, MD) に再懸濁させ、5%CO₂インキュベーター内でインキュベートした。3継代目に、メサンギウム細胞を、典型的な形態学的特徴、トリプシン、ピューロマイシンおよびD-バリンに対する耐性、アクチン (Zymed Laboratories社, San Francisco, CA) 、抗VLA(very late

antigen)-1,3,5 (Immunotech) の免疫染色に対して陽性を示すこと、ならびに第VIII因子 (Dako社, CA) の免疫染色に陰性を示すことなどの一連の基準により同定した。

【0034】

【実施例2】 ヒト培養メサングウム細胞からのmRNAの単離

6継代目に、グアニジンイソチオシアネート (GTC) 法を用いて、全RNAをヒトメサングウム細胞から単離した。即ち、実施例1の細胞の血清を含む培養液中のメサングウム細胞コンフルエント培養物をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄し、5.5mM GTC溶液中で溶解させた。DNAは18ゲージの針を通過させることにより除去した。核およびその他の細胞破片は5,000×gで90秒間遠心分離することにより沈殿させた。上清をセシウムトリフルオロアセテート (CsTFA) 層に注意深く載せ、15℃、125,000×gで24時間遠心分離した。RNAペレットをTEバッファーに溶解させた。オリゴdTセルロースカラム (ファルマシア社) により、poly(A)⁺RNAを分離した。

【0035】

【実施例3】 3' 方向cDNAライブラリーの構築

poly(A)⁺RNAを鋳型として、pUC19を基礎とするベクタープライマー [Norrander J., et al., Gene, 26, 101-106 (1983)] を用いたcDNA合成を行った。このベクタープライマーDNAは、HincII末端、およびTテールをもつPstI末端を有し、MboI部位 (GATC) でダム・メチル化 (dam-methylated) されていた。第2鎖の合成の後、cDNA配列、およびベクターのlacZ遺伝子内の単一BamHI部位を、それぞれMboIおよびBamHIで切断し、次に、低DNA濃度で環状化およびライゲーションを行った。ライゲーション混合物のうちの一部を大腸菌に形質転換した。得られた形質転換体をランダムに選択し、簡単に加熱することにより個別に溶解させた。cDNA挿入配列を、pUC19クローニングサイトに隣接するプライマー (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3' および 5'-ACCATGATTACGCCAAGCTTG-3') を用いたペアードPCRにより増幅させた。得られた短い二本鎖DNAを、サイクル配列決定反応に用い、自動配列決定機で解析した。

【0036】

【実施例4】メサングウム細胞で特異的に発現している遺伝子の単離

メサングウム細胞で特異的に発現している遺伝子を同定するため、本発明者らは、大規模なDNA配列決定およびコンピュータによるデータ処理を行った。このことにより、様々な異なる細胞および臓器における転写産物を同時に比較することができた (Y. Yasuda et al., submitted; K. Matsubara et al., Gene. 135, 265 (1993); K. Okubo et al., Nat. Gen. 2, 173 (1992))。ヒト培養メサングウム細胞の3'方向cDNAライブラリーの大規模DNA配列決定を行い、ランダムに選択した1836個のクローンの部分配列を決定した。クローンの配列相同性を、相互に比較し、さらにFASTAプログラムを用いてDNAデータバンクGenBankと比較した。様々な臓器および細胞からのmRNAをドットプロット解析することにより、メサングウム細胞で特異的に発現しているクローンが選択された。その結果、本発明者らのメサングウム細胞cDNAライブラリーにのみ検出されるクローンのうち、最も多く存在する一つのクローンが得られた。このクローンは、全mRNAのうちの0.3%を含んでいた。

【0037】

【実施例5】5' RACE法による完全鎖長のクローニング

「5'-Full RACE Core Set」(宝酒造(株)製)を用いて、下記の実験を行った。0.5mlマイクロチューブにヒト培養メサングウム細胞から調製したpoly(A)⁺RNA (0.5 μg/μl) 4.0 μl、10×RTバッファー1.5 μl、RNaseインヒビター (40U/μl) 0.5 μl、AMV Reverse Transcriptase XL (5U/μl) 1 μl、5'末端リン酸化RTプライマー (5' - pTCAGAGAGGTCATTC, 200pmol/μl) 1 μlを加え、RNaseFree d H₂O 7 μlで全量を15 μlとした。この反応液を「Takara PCR Thermal Cycler」(宝酒造(株)製)にセットし、30℃10分、50℃60分、80℃2分、4℃10分インキュベーションし、第1鎖cDNAを得た。

【0038】

反応液から15 μlを5×ハイブリッドRNA変性バッファー15 μl、H₂O 45 μlを含む0.5mlマイクロチューブ中に加えた。RNaseH 1 μlを加え、30℃で1時間反応を行った。反応終了後、エタノール150 μlを加え-70℃で30分冷却後、遠心し、上清を除去し、沈殿物を集めた。

【0039】

得られた沈殿物に5×RNA (ssDNA) ライゲーションバッファー8 μ l、40% PEG #600 20 μ l、H₂O 12 μ lを加え、よく混ぜ、T4リガーゼを1 μ l加えて16℃で15時間反応し、環化一本鎖cDNAを得た。

【0040】

得られた環化一本鎖cDNAをTEバッファーで10倍希釈したものを鋳型とし、一次PCRをおこなった。反応条件は、10×LA PCRバッファー-II (Mg²⁺plus) 5 μ l、dNTP混合物 (2.5mM) 8 μ l、一次PCR S1プライマー (5'-TCATTGATGGGTCCTCAA, 20pmol/ μ l) 0.5 μ l、一次PCR A1プライマー (5'-AGATTCTTGAGCTCAGAT, 20pmol/ μ l) 0.5 μ l、TaKaRa LA TaqTM (5U/ μ l) 0.5 μ l、滅菌水で全量を50 μ lとした。「Takara PCR Thermal Cycler」にセットし、94℃3分加熱後、94℃30秒、60℃30秒、72℃2分を25サイクル反応させた。

【0041】

一次PCR反応溶液から1 μ lを鋳型とし、10×LA PCR TMバッファー-II (Mg²⁺plus) 5 μ l、dNTP混合物 (2.5mM) 8 μ l、二次PCR S2プライマー (5'-AATGGTGGCATAAA CATG, 20pmol/ μ l) 0.5 μ l、二次PCR A2プライマー (5'-ACAGACAAATTGAACTTC, 20pmol/ μ l) 0.5 μ l、TaKaRa LA TaqTM (5U/ μ l) 0.5 μ l、滅菌水で全量を50 μ lとした。「Takara PCR Thermal Cycler」にセットし、94℃30秒、60℃30秒、72℃2分で30サイクル反応させた。

【0042】

0.75%アガロースゲル電気泳動法でバンドが得られていることを確認し、反応溶液中から1 μ lを「Original TA Cloning Kit」(Invitrogen社)を用いてサブクローニングし、得られたプラスミドを「pCR-942-5.3」とした。挿入された遺伝子断片の塩基配列をジデオキシターミネーション法により決定した。

【0043】

得られた塩基配列は、遺伝子産物のN末部分をコードする約600ヌクレオチドを含み5'非翻訳領域として約400ヌクレオチドを含んでいた。予想される開始コドンATGの位置が、コンセンサス配列と一致し、最長のオープンリーディングフレーム(「the first ATG rule」を満足する)を与えた。MEGSIN cDNAの塩基配列

を配列番号：1に、MEGSINの推定アミノ酸配列を配列番号：2に示す。

【0044】

〔実施例6〕 蛋白質の発現

翻訳領域を含む遺伝子を得るために、ヒト培養メサンギウム細胞poly(A)⁺RNA (0.5 μ g/ μ l) 1.0 μ lを鋳型とし、翻訳領域をコードするように設計したプライマー、すなわち、開始コドンを含み5'端に制限酵素EcoRI認識配列を加えたプライマー (5'-GAATTCATGGCCTCCCTTGCTGCAGCAAA) 及びストップコドンとSalI認識配列を加えたプライマー (5'-GTCGACTTATCAAGGGCAAGAACTTTGCC) でPCR反応をおこなった。反応条件は、10×Ex Taqバッファー5 μ l、dNTP混合物 (2.5mM) 8 μ l、PCRプライマー (5'-GTCGACTTATCAAGGGCAAGAACTTTGCC、20pmol/ μ l) 0.5 μ l、一次PCR A1プライマー (5'-GAATTCATGGCCTCCCTTGCTGCAGCAAA、20pmol/ μ l) 0.5 μ l、TaKaRa Ex TaqTM (10U/ μ l) 0.5 μ l、滅菌水で全量を50 μ lとした。「TakaRa PCR Thermal Cycler」にセットし、94℃1分、60℃2分、72℃2分を30サイクル反応させた。0.75%アガロースゲル電気泳動法でバンドが得られていることを確認し、反応溶液夜中から1 μ lを「Original TA Cloning Kit」(Invitrogen社)を用いてサブクローニングし、得られたプラスミドをpCR-942CD-11/2とした。pCR-942CD-11/2で形質転換した大腸菌JM109を通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に平成9年9月22日に国内寄託した(受託番号FERM P-16440)。このプラスミドをEcoRIとSalIで切断し、挿入遺伝子を、EcoRIとSalIで切断したマルトース結合蛋白質融合蛋白質発現用ベクター、pMAL-c (New England Biolab社)と、T4リガーゼを用い結合し、大腸菌XL1-Blueを形質転換した。18時間後、アンピシリン耐性株を3mlのLB培養液に植え、18時間培養後、ミニプレ法によりプラスミドを抽出し、制限酵素で確認し、発現ベクター、pMAL-MEGSINを得た。pMAL-MEGSINで形質転換した大腸菌XL1-Blueを通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に平成9年9月22日に国内寄託した(受託番号FERM P-16439)。

【0045】

pMAL-MEGSINで形質転換した大腸菌XL1-Blueを100 μ g/mlになるようにアンピシリンを加えた10mlのLB培地で37℃、18時間振とう培養し、この培養液を1lのRich増地 (1l中に10gトリプトン、5g酵母抽出物、5g NaCl、2gグルコースを含みア

ンピシリンを100 $\mu\text{g/ml}$ になるように加えたもの)に加え37℃で振とう培養した。濁度計にて約0.40D (A_{600}) になったところで0.1M IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactoside 1.41gを水50mlに溶解したもの) 3mlを加え、続けて37℃で振とう培養した。2時間後、遠心操作 (4000g \times 20分) により菌体を集め、50mlの溶解バッファー (10mM Na_2HPO_4 、30mM NaCl、0.25% Tween20, pH7.0) を加えた。よく懸濁し、-80℃で18時間凍結後、ソニケーション (BRANSON社: SONIFIER250) し、菌体を粉碎した。0.5MになるようにNaClを加え、遠心操作 (10000g \times 30分) により上清を集めた。上清に200mlの0.25% Tween20/カラムバッファーを加え、あらかじめ0.25% Tween20/カラムバッファー (0.25% Tween20、10mM リン酸、0.5M NaCl, pH7.2) で平衡化したアミロース樹脂30mlを充填したカラムにロードした。1ml/分の流速で、100mlの0.25% Tween20/カラムバッファー、次に150mlのカラムバッファーで洗った後、マルトースを10mMになるように加えたカラムバッファー、50mlでアミロース樹脂に結合した融合蛋白質を溶出した。これを限外濾過器 (Amicon stirred-cell concentrator) で約1mg/mlまで濃縮した。

【0046】

融合しているマルトース結合蛋白質は以下の方法で酵素により切断除去できる。蛋白質溶液を透析チューブ (分画分子量 3,500) に入れファクターXaバッファー (20mM Tris \cdot Cl、100mM NaCl、2mM CaCl_2 、1mM アジ化ナトリウム) に対して透析する。透析した溶液200 μl (1mg/ml) に10 μl のファクターXa (200 $\mu\text{g/ml}$) を加え、24時間、室温で反応することにより、マルトース結合蛋白質と目的とする蛋白質との結合部位を特異的に切断する。切断後、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換カラムクロマトグラフィーなどで精製をおこなうことにより目的とする蛋白質が得られる。

【0047】

【表1】

←MBP

目的とする蛋白質→

-----CTCGGGATCGAGGGAGGATTTTCAGAATTCATGGCC-----

-----LeuGlyIleGluGlyArgIleSerGluPheMetAla-----

↑

ファクターXa認識部位

[実施例7] メサングウム特異的遺伝子の機能解析 (1)

SwissProtデータベースでFASTAプログラムによりアミノ酸ホモロジー検索を行ったところ、この遺伝子産物が、SERPIN (セリンプロテアーゼインヒビター) スーパーファミリー [R. Carrell et al., Trends Biochem. Sci. 10, 20 (1985); R. Carrell et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 52, 527 (1987); E. K. O. Kruithof et al., Blood 86, 4007 (1995); J. Potempa et al., J. Biol. Chem. 269, 15957 (1994); E. Remold-O'Donnell, FEBS Let. 315, 105 (1993)] に属するタンパク質と相同性が高いことが明らかになった。SERPINスーパーファミリーとは、構造的に関連しているタンパク質群であり、一般的に細胞外の不可逆的なセリンプロテアーゼインヒビターとして機能する。扁平上皮細胞癌抗原1 (SCCA1) が、メサングウム特異的遺伝子と最も高い相同性 (41.2% 同一) を示し、それにSERPINスーパーファミリーの他のタンパク質、SCCA2 (40.6%)、白血球エステラーゼインヒビター (37.5%)、およびプラスミノゲンアクチベーターインヒビター-2 (PAI-2) (35.2%) が続いた。したがって、本発明者らは、この遺伝子を「MEGSIN」 (mesangial cell-specific gene with a homology to serpin) と名付けた。

【0048】

「MEGSIN」のアミノ酸配列をモチーフ検索した (図1)。まず、COOH末端にSERPINの特徴が存在することが明らかになった。また、4つの推定N-グリコシル化部位が存在した。明らかなNH₂末端シグナルペプチド配列は、見出されなかったが、αヘリックスA (アミノ酸1~16) およびαヘリックスB (アミノ酸27~44) に、2つの疎水性領域が存在した。これらは、SERPINの転移に重要な役割を果たすと考えられる (G. von Heijne et al., J. Biol. Chem. 266, 15240 (1991));

D. Belin. *Thromb. Haemost.* 70, 144 (1993); D. Belin et al., *EMBO J.* 15, 468 (1996))。いくつかのSERPINは、 α ヘリックスAおよびB中の非分解性内部シグナル配列により、分泌されるかまたは細胞質に存在する二次元的な分子 (dual istic molecule) として存在すると考えられている (R. D. Ye et al., *J. Biol. Chem.* 263, 4869 (1988); A. Wohlwend et al., *J. Immunol.* 139, 1278 (1987); A. Wohlwend et al., *J. Exp. Med.* 165, 320 (1987); C. Genton et al., *J. Cell Biol.* 104, 705 (1987); P. Mlkus et al., *Eur. J. Biochem.* 218, 1071 (1993))。SERPINスーパーファミリーの他のタンパク質と比較することにより、アミノ酸334~352が反応部位ループ (reactive site loop/RSL) (P16-P5') (P. C. Hopkins et al., *Science*. 265, 1893 (1994); K. Aertgeerts et al., *Nature Struct. Biol.* 2, 891 (1995); P. A. Patston et al., *FEBS Let.* 383, 87 (1996); H. T. Wright. *BioEssays*. 18, 453 (1996)) に相当することが示唆された (図2)。いくつかのSERPINは、プロテアーゼ阻害ではなく、ホルモンの輸送または血圧制御のような機能を有するが、「MEGSIN」がプロテアーゼ阻害を行うことを示す3つの証拠が存在する。まず一つとして、「MEGSIN」のRSLのPeven残基は、電荷をもたず、小さく、非極性であるが、これは阻害SERPINの特徴である。第2に、阻害SERPINは、ヒンジ領域と呼ばれるRSLのNH₂末端領域 (P12-P9) に「Ala-Ala(Thr)-Ala-Ala」なる配列を有する。「MEGSIN」のRSLのP12-P9は、「ATAA」である。「MEGSIN」のRSLのP17-P8配列 (EGTEATAAT) は、実際、阻害SERPINのコンセンサス配列 (EGTEAAAAT) と一致する。第3として、RSLのNH₂末端側の直前には β シート領域が存在することが知られている。これは、プロテアーゼ阻害に必須であり、適当なコンフォメーションの変化を達成するためヒンジ領域のアミノ酸の大きさと電荷を制限している。「MEGSIN」には、この β シート領域が保存されている。

【0049】

RSL (P1およびP1') 内の推定される切断されやすい結合に隣接する残基は、Lys-Glnであり、基質特異性を決定するために重要であると考えられる (T. E. Creighton et al., *J. Mol. Biol.* 194, 11 (1987); P. Gettins et al., *BioEssays* 15, 461 (1993); P. E. Stein et al., *Struct. Biol.* 2, 96 (1995))。この

部位に関連した配列を有している他の阻害SERPINは知られていない。Kunitz型ウシ塩基性プロテアーゼインヒビターのようなSERPINは、P1にLysを有しており、トリプシンを強力に阻害することが知られている。「MEGSIN」の標的セリンプロテアーゼは、したがって、リジン切断プロテアーゼであると考えられる。

【0050】

【実施例8】「MEGSIN」の機能解析(2) - 組織分布

「MEGSIN」のノーザンブロット解析は、以下のようにして行った。RNAをヒトメサンギウム培養細胞から単離した。培養細胞のpoly(A)⁺RNA (5 μg) を、2.2Mホルムアミドを含む1%アガロースゲルで分離し、ニトロセルロースフィルターへ転写した。フィルターをRapid Hyb溶液 (Amersham社, Arlington Heights, IL) 中でハイブリダイズさせた。ブロットは、60℃で、0.1×SSPE/0.1% SDSという最終ストリンジェンシーで洗浄した。

【0051】

ヒトの複数の組織のノーザンブロット、ヒトの癌細胞系のノーザンブロットはClontech (Palo Alto, CA) から購入した。ヒトの複数の組織のノーザンブロットには、心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、および脾臓の2 μgのpoly(A)⁺RNAが含まれる。ヒトの癌細胞系のノーザンブロットには、前骨髄球白血病HL-60、HeLa細胞S3、慢性骨髄性白血病K-562、リンパ芽球白血病MOLT-4、Burkittリンパ腫Raji、大腸腺癌SW480、肺癌A549、および黒色腫G361由来の2 μgのpoly(A)⁺RNAが含まれる。ハイブリダイゼーションおよび洗浄は上記と同様にして行った。

【0052】

MEGSIN cDNAプローブを用いたノーザンブロット解析で、メサンギウム培養細胞に単一の転写産物が検出された。他の臓器または細胞系には検出されなかった(図3)。「MEGSIN」転写産物は、ヒト腎臓由来のpoly(A)⁺RNAには検出されなかった。その原因の一つは、腎臓には内皮細胞、上皮細胞、および他の様々な細胞が存在し、メサンギウム細胞の数が少ないためと考えられる。

【0053】

実際、MEGSIN転写産物は、腎臓組織からRT-PCRにより増幅された。RT-PCRは、

ヒト培養細胞から単離した全RNAを鋳型として、「T-Primed-First-Strand kit」(ファルマシアバイオテク(株))を用いて行った。PCR増幅は、「DNA Thermal Cycler」(Perkin Elmer Cetus)により、94℃1分、60℃2分、72℃2分を、25サイクル行った。センスプライマーとして「5'-ATGATCTCAGCATTGTGAATG-3'」、アンチセンスプライマーとして「5'-ACTGAGGGAGTTGCTTTTCTAC-3'」を用いた。増幅された断片の予想サイズは、773bpであった。異なる試料間のRNAレベルを比較することができるように、 β -アクチンを内部RNAコントロールとして使用した。PCR産物は、1%アガロースゲル電気泳動により分離した。「MEGSIN」転写産物は、ヒト繊維芽細胞、平滑筋細胞、内皮細胞、上皮細胞、ケラチノサイトからは、RT-PCRにより増幅されなかった(図4)。

【0054】

また、メサンギウム培養細胞は、活性化および／または増殖する時に、特徴的な新たな表現形質を獲得することが知られている(R. J. Johnson et al., J. Am. Soc. Nephrol. 2 (10 Suppl), S190 (1992); J. Floege et al., Kidney Int. 45, 360 (1994))。したがって、「MEGSIN」の発現は、メサンギウム細胞が活性化および／または増殖した時にのみノーザンブロット解析により検出可能なレベルにまで増強されるのかもしれない。ヒト腎組織のin situハイブリダイゼーションの結果(下記)は、この仮説と一致していた。

【0055】

【実施例9】 「MEGSIN」の機能解析(3) - IgA腎症患者と健常人の発現量対比

in situハイブリダイゼーションにより、18人のIgA腎症(IgA-N)患者および3人の健常人の腎臓から得られたヒト腎組織で、MEGSIN mRNA発現を評価した。in situハイブリダイゼーションは、以前に示した方法により行った(Kidney Int. 52, 111 (1997))。ヒトMEGSIN cDNAの391~428位のヌクレオチド配列をプローブとして用いた。IgA-N患者を、メサンギウムの増殖が主要で糸球体硬化症は少ないグループ(増殖期、n=9)、糸球体の30%以上が硬化しているグループ(硬化期、n=9)の2つのグループに分けた。MEGSIN mRNAは、健常者でもIgA-Nでも、糸球体にのみ検出された(図5A)。糸球体内で、MEGSIN転写産物はメサンギ

ウム細胞に局在化していた（図5Bおよび図5C）。シグナルの特異性を評価するため、ハイブリダイゼーションの前にRNaseで組織を前処理すると、MEGSINプローブで検出されるシグナルの大部分が除去された。また、100倍過剰の同種または無関係の未標識オリゴヌクレオチドで競合実験を行ったところ、MEGSINシグナルは、同種オリゴヌクレオチド競合剤で消失したが、非同種オリゴヌクレオチドでは消失しなかった。MEGSIN mRNA発現を定量化するため、少なくとも10個のランダムに選択された糸球体中の核全て、および周囲に陽性細胞質を有する核（脈管極の切断面）を盲検的に数え、結果を全核の陽性細胞のパーセントとして表した。Mann-Whitney U検定を統計比較に用いた。増殖期のIgA-NにおけるMEGSIN陽性細胞は、健常人の腎臓よりも有意に多かった。これらの知見は、本発明者らの、「MEGSIN」の発現がメサングウム細胞が活性化および／または増殖したときに増強されるという仮説を立証するものである。

【0056】

〔実施例10〕 抗MEGSIN抗体の製造

(1) 「MEGSIN」の合成ペプチドに対するポリクローナル抗体の製造

MEGSIN蛋白質のN末端から342～356番目のペプチドのN末端にシステインを含有するペプチド「H₂N-C-S-N-I-V-E-K-Q-L-P-Q-S-T-L-F-R-COOH」を固相ペプチド法により合成し、高速液体クロマトグラフィーにより精製し、MBS（m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシルスクシニミドエステル）を用いてキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）に結合させた。ウサギ1匹をフロインド完全アジュバントと混合したKLH結合ペプチド（200μg/匹）で皮内免疫した。初回免疫化後、2週間後、4週間後、6週間後にウサギにフロインド不完全アジュバントと混合したKLH結合ペプチド（200μgペプチド/匹）をブースターとして追加免疫した。44日後、59日後、64日後、採血で得た血清が合成ペプチドと反応するか確認するため、酵素免疫測定法（ELISA）により評価した。合成ペプチドを1μg/ウェルで96穴マイクロウェルプレート上に被覆し、プレートを洗浄し、そしてウシ血清アルブミンでブロックした。種々の希釈度で血清試料について抗体の反応性を二次抗体としてHRP-結合ヤギ抗ウサギIgG、基質として0-フェニレンジアミンを用いて測定した。吸光度の測定は反応を停止した後に492nmの波長で行った。その結果、4

4日後、59日後、64日後に、それぞれ抗体価が6,800倍、20,500倍、25,400倍に上昇していることを確認した。得られた抗体はウエスタンブロットによりMEGSIN融合蛋白質と反応することを確認し、MEGSIN蛋白質に特異的であることを証明した。

【0057】

(2) MBP-MEGSINに対するポリクローナル抗体の製造

実施例6で得られた濃縮融合蛋白質MBP-MEGSIN (10mM リン酸ナトリウム、0.5M NaCl、10mM マルトース) を等量のプロインド完全アジュバントと混合し、充分乳化した。この乳液0.5mlを、ニュージーランドホワイトウサギ (雌、約4000g) の皮下に投与した (20 μ g/匹)。1回目免疫後、プロインド不完全アジュバントと混合したMBP-MEGSINで、3週間後 (50 μ g/匹)、5週間後 (50 μ g/匹)、7週間後 (50 μ g/匹)、9週間後 (100 μ g/匹)、11週間後 (200 μ g/匹) に追加免疫した。3回目の免疫後、1週間後に試験採血を行い、抗体価を測定した結果、204800倍に上昇していることを確認した。抗体価の測定は、抗原50ng/ウェルを固相化した96穴プレートを用いたEIAによって行った。連続的に希釈した抗血清を各ウェルに100 μ lづつ加えて一次反応を行い、上清除去、洗浄後、抗ウサギIgG Fab'-HRP (IBL、日本) を反応させ、洗浄後、OPD (Sigma, USA) で発色して測定した。また、得られた抗血清は、ウエスタンブロットにより、MBP-MEGSINと特異的に反応することを確認した。

【0058】

(3) MBP-MEGSINに対するモノクローナル抗体の製造

実施例6で得られた濃縮融合蛋白質MBP-MEGSIN (10mM リン酸ナトリウム、0.5M NaCl、10mM マルトース) を等量のプロインド完全アジュバントと混合し、充分乳化した。この乳液を、3匹の7週齢のBalb/cマウスに27Gの注射針にて皮下、皮内注射し、その後7日毎にプロインド不完全アジュバントを用いて4回免疫を行った (1回目: 20 μ g/匹、2~4回: 10 μ g/匹)。4回免疫後、尾静脈より少量採血し、抗体価を測定した。抗体価の測定は、抗原50ng/ウェルを固相化したイムノプレートを用いたEIAによって行った。次に、マウスの脾臓細胞をミエローマ細胞株X-63 Ag8とPEGを用いた常法により細胞融合した。その後、免疫原、MBP、BSA

などを固定化した96穴プレートを用いたEIAによってスクリーニングを行い、免疫原に特異的なモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを選択することができる。

【0059】

【発明の効果】

本発明により、メサンギウム細胞に特異的に発現しているDNA、該DNAのコードするタンパク質、該タンパク質に結合する抗体等が提供された。これらはメサンギウム細胞特有のものであり、メサンギウム細胞の同定、メサンギウム細胞の異常の検出などに有用である。更に、該タンパク質の機能からメサンギウム細胞の機能が明らかになり、メサンギウム細胞に関連する疾患の原因が究明され、ひいては、メサンギウム細胞に関連する疾病の治療、診断等が可能となることが期待できる。

【0060】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：1143

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：1..1143

特徴を決定した方法：E

配列

ATG GCC TCC CTT GCT GCA GCA AAT GCA GAG TTT TGC TTC AAC CTG TTC	48
Met Ala Ser Leu Ala Ala Ala Asn Ala Glu Phe Cys Phe Asn Leu Phe	
1 5 10 15	
AGA GAG ATG GAT GAC AAT CAA GGA AAT GGA AAT GTG TTC TTT TCC TCT	96
Arg Glu Met Asp Asp Asn Gln Gly Asn Gly Asn Val Phe Phe Ser Ser	
20 25 30	
CTG AGC CTC TTC GCT GCC CTG GCC CTG GTC CGC TTG GGC GCT CAA GAT	144
Leu Ser Leu Phe Ala Ala Leu Ala Leu Val Arg Leu Gly Ala Gln Asp	
35 40 45	
GAC TCC CTC TCT CAG ATT GAT AAG TTG CTT CAT GTT AAC ACT GCC TCA	192
Asp Ser Leu Ser Gln Ile Asp Lys Leu Leu His Val Asn Thr Ala Ser	
50 55 60	
GGA TAT GGA AAC TCT TCT AAT AGT CAG TCA GGG CTC CAG TCT CAA CTG	240
Gly Tyr Gly Asn Ser Ser Asn Ser Gln Ser Gly Leu Gln Ser Gln Leu	
65 70 75 80	
AAA AGA GTT TTT TCT GAT ATA AAT GCA TCC CAC AGG GAT TAT GAT CTC	288

Lys Arg Val Phe Ser Asp Ile Asn Ala Ser His Arg Asp Tyr Asp Leu	
85 90 95	
AGC ATT GTG AAT GGG CTT TTT GCT GAA AAA GTG TAT GGC TTT CAT AAG	336
Ser Ile Val Asn Gly Leu Phe Ala Glu Lys Val Tyr Gly Phe His Lys	
100 105 110	
GAC TAC ATT GAG TGT GCC GAA AAA TTA TAC GAT GCC AAA GTG GAG CGA	384
Asp Tyr Ile Glu Cys Ala Glu Lys Leu Tyr Asp Ala Lys Val Glu Arg	
115 120 125	
GTT GAC TTT ACG AAT CAT TTA GAA GAC ACT AGA CGT AAT ATT AAT AAG	432
Val Asp Phe Thr Asn His Leu Glu Asp Thr Arg Arg Asn Ile Asn Lys	
130 135 140	
TGG GTT GAA AAT GAA ACA CAT GGC AAA ATC AAG AAC GTG ATT GGT GAA	480
Trp Val Glu Asn Glu Thr His Gly Lys Ile Lys Asn Val Ile Gly Glu	
145 150 155 160	
GGT GGC ATA AGC TCA TCT GCT GTA ATG GTG CTG GTG AAT GCT GTG TAC	528
Gly Gly Ile Ser Ser Ser Ala Val Met Val Leu Val Asn Ala Val Tyr	
165 170 175	
TTC AAA GGC AAG TGG CAA TCA GCC TTC ACC AAG AGC GAA ACC ATA AAT	576
Phe Lys Gly Lys Trp Gln Ser Ala Phe Thr Lys Ser Glu Thr Ile Asn	
180 185 190	
TGC CAT TTC AAA TCT CCC GAG TGC TCT GGG AAG GCA GTC GCC ATG ATG	624
Cys His Phe Lys Ser Pro Glu Cys Ser Gly Lys Ala Val Ala Met Met	
195 200 205	
CAT CAG GAA CGG AAG TTC AAT TTG TCT GTT ATT GAG GAC CCA TCA ATG	672
His Gln Glu Arg Lys Phe Asn Leu Ser Val Ile Glu Asp Pro Ser Met	
210 215 220	
AAG ATT CTT GAG CTC AGA TAC AAT GGT GGC ATA AAC ATG TAC GTT CTG	720
Lys Ile Leu Glu Leu Arg Tyr Asn Gly Gly Ile Asn Met Tyr Val Leu	
225 230 235 240	

CTG CCT GAG AAT GAC CTC TCT GAA ATT GAA AAC AAA CTG ACC TTT CAG	768
Leu Pro Glu Asn Asp Leu Ser Glu Ile Glu Asn Lys Leu Thr Phe Gln	
245 250 255	
AAT CTA ATG GAA TGG ACC AAT CCA AGG CAA ATG ACC TCT AAG TAT GTT	816
Asn Leu Met Glu Trp Thr Asn Pro Arg Gln Met Thr Ser Lys Tyr Val	
260 265 270	
GAG GCA TTT TTT CCT CAG TTC AAG ATA GAG AAG AAT TAT GAA ATG AAA	864
Glu Ala Phe Phe Pro Gln Phe Lys Ile Glu Lys Asn Tyr Glu Met Lys	
275 280 285	
CAA TAT TTG AGA GCC CTA GGG CTG AAA GAT ATC TTT GAT GAA TCC AAA	912
Gln Tyr Leu Arg Ala Leu Gly Leu Lys Asp Ile Phe Asp Glu Ser Lys	
290 295 300	
GCA GAT CTC TCT GGG RTT GCT TCG GGG GGT CGT CTG TAT ATA TCA AGG	960
Ala Asp Leu Ser Gly Val Ala Ser Gly Gly Arg Leu Tyr Ile Ser Arg	
305 310 315 320	
ATG ATG CAC AAA TCT TAC ATA GAG GTC ACT GAG GAG GGC ACC GAG GCT	1008
Met Met His Lys Ser Tyr Ile Glu Val Thr Glu Glu Gly Thr Glu Ala	
325 330 335	
ACT GCY GCC ACA GGA AGT AAT ATT GTA GAA AAG CAA CTC CCT CAG TCC	1056
Thr Ala Ala Thr Gly Ser Asn Ile Val Glu Lys Gln Leu Pro Gln Ser	
340 345 350	
ACG CTG TTT AGA GCT GAC CAC CCA TTC CTA TTT GTT ATC AGG AAG GAT	1104
Thr Leu Phe Arg Ala Asp His Pro Phe Leu Phe Val Ile Arg Lys Asp	
355 360 365	
GAC ATC ATC TTA TTC AGT GGC AAA GTT TCT TGC CCT TGA	1143
Asp Ile Ile Leu Phe Ser Gly Lys Val Ser Cys Pro	
370 375 380	

配列番号 : 2

配列の長さ : 380

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列

Met Ala Ser Leu Ala Ala Ala Asn Ala Glu Phe Cys Phe Asn Leu Phe

1 5 10 15

Arg Glu Met Asp Asp Asn Gln Gly Asn Gly Asn Val Phe Phe Ser Ser

20 25 30

Leu Ser Leu Phe Ala Ala Leu Ala Leu Val Arg Leu Gly Ala Gln Asp

35 40 45

Asp Ser Leu Ser Gln Ile Asp Lys Leu Leu His Val Asn Thr Ala Ser

50 55 60

Gly Tyr Gly Asn Ser Ser Asn Ser Gln Ser Gly Leu Gln Ser Gln Leu

65 70 75 80

Lys Arg Val Phe Ser Asp Ile Asn Ala Ser His Arg Asp Tyr Asp Leu

85 90 95

Ser Ile Val Asn Gly Leu Phe Ala Glu Lys Val Tyr Gly Phe His Lys

100 105 110

Asp Tyr Ile Glu Cys Ala Glu Lys Leu Tyr Asp Ala Lys Val Glu Arg

115 120 125

Val Asp Phe Thr Asn His Leu Glu Asp Thr Arg Arg Asn Ile Asn Lys

130 135 140

Trp Val Glu Asn Glu Thr His Gly Lys Ile Lys Asn Val Ile Gly Glu

145 150 155 160

Gly Gly Ile Ser Ser Ser Ala Val Met Val Leu Val Asn Ala Val Tyr

165 170 175

Phe Lys Gly Lys Trp Gln Ser Ala Phe Thr Lys Ser Glu Thr Ile Asn

180 185 190

Cys His Phe Lys Ser Pro Glu Cys Ser Gly Lys Ala Val Ala Met Met

195	200	205
His Gln Glu Arg Lys Phe Asn Leu Ser Val Ile Glu Asp Pro Ser Met		
210	215	220
Lys Ile Leu Glu Leu Arg Tyr Asn Gly Gly Ile Asn Met Tyr Val Leu		
225	230	235
Leu Pro Glu Asn Asp Leu Ser Glu Ile Glu Asn Lys Leu Thr Phe Gln		240
245	250	255
Asn Leu Met Glu Trp Thr Asn Pro Arg Gln Met Thr Ser Lys Tyr Val		
260	265	270
Glu Ala Phe Phe Pro Gln Phe Lys Ile Glu Lys Asn Tyr Glu Met Lys		
275	280	285
Gln Tyr Leu Arg Ala Leu Gly Leu Lys Asp Ile Phe Asp Glu Ser Lys		
290	295	300
Ala Asp Leu Ser Gly Val Ala Ser Gly Gly Arg Leu Tyr Ile Ser Arg		
305	310	315
Met Met His Lys Ser Tyr Ile Glu Val Thr Glu Glu Gly Thr Glu Ala		320
325	330	335
Thr Ala Ala Thr Gly Ser Asn Ile Val Glu Lys Gln Leu Pro Gln Ser		
340	345	350
Thr Leu Phe Arg Ala Asp His Pro Phe Leu Phe Val Ile Arg Lys Asp		

355	360	365
Asp Ile Ile Leu Phe Ser Gly Lys Val Ser Cys Pro		
370	375	380

【図面の簡単な説明】

【図1】

メグシンのアミノ酸配列を示す図である。アンダーライン部は「SERPIN」シグニチャーを示す。四角で囲まれた部分はRSL (reactive center loop) を示し、矢印は予想される反応部位を示す。また、2つの予想される疎水性領域をそれぞれ点線で示す。

【図2】

「MEGSIN」と、セルピンスーパーファミリーに属する他のタンパク質とのアミノ酸配列の比較を示す図である。(A) 一致する領域は、棒により示した。棒の隙間は、アラインメントを最適化するために、データベース配列に隙間を挿入した領域を表し、棒を横切る線は、問題の配列と比較してデータベース配列に残基を挿入した領域を表す。これらの配列は、「the protein scoring matrix pam 250」に従い整列させた。スコアを棒の右に示す(最大可能スコアは1820である)。(B) は、SERPINのRSLの比較を示す図である。RSLのP17-P5' (SchecherとBergerの番号付けによる) を整列させた。非極性残基は太字で示す。「SCC1」は扁平上皮細胞癌抗原1 (SCCA1) を、「ILEU」はエラスターゼインヒビターを、「PAI-2」はプラスミノゲン活性化因子阻害剤-2 (PAI-2) を、「ova」はオボアルブミンをそれぞれ示す。

【図3】

MEGSIN転写産物の検出を示すノーザンブロット写真である。各レーンは次の通り。レーン1: メサングウム細胞、レーン2: 前骨髄球白血病HL-60、レーン3: HeLa細胞S3、レーン4: 慢性骨髄性白血病K-562、レーン5: リンパ芽球白血病MOLT-4、レーン6: Burkittリンパ腫Raji、レーン7: 大腸腺癌SW480、レーン8: 肺癌A549、レーン9: 黒色腫G361。実験は、以下のように行った。心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、および脾臓由来の2 μ gのポリA⁺ RNAを含む、ヒトマルティプルノーザンブロット (クロンテック社、米国カリフォルニア州)、前骨髄球白血病HL-60、HeLa細胞S3、慢性骨髄性白血病K-562、リンパ芽球白血病MOLT-4、バーキット (Burkitt) リンパ腫Raji、結腸直腸腺癌SW480、肺癌A549、および黒色腫G361由来の2 μ gのポリA⁺ RNAを含むヒト癌細胞系ノーザンブロット (クロンテック社、米国カリフォルニア州) を用いた。RNAをヒトメサングウム培養細胞から単離し、ポリA⁺ RNA (2 μ g) を2.2M ホルムアミド含有1%アガロースゲルにて分離し、上記ブロット用フィルターに転写した。そのフィルターを「Rapid Hyb solution (アマシャム社)」中でハイブリダイズした。フィルターを、0.1×SSPE/0.1%の最終ストリンジェンシーになるよう、60℃で洗浄した。

【図4】

RT-PCR実験の結果を示す写真である。各レーンは次の通り。レーン1: メサングウム細胞、レーン2: 平滑筋細胞、レーン3: 繊維芽細胞、レーン4: 内皮細胞、レーン5: 腎臓上皮細胞、レーン6: ケラチノサイト、レーン7: 単球、レーン8: 多形核白血球 (上の写真)。全RNAを、ヒト培養細胞から単離し「T-Primed-First-Strand」キット (ファルマシアバイオテク (株)) を用いて逆転写した。PCR増幅は、DNA サーマルサイクラー (パーキンエルマー社) を用いて、25回実施した。各サイクルは、メグシンのオリゴヌクレオチドプライマー: センス、5'-ATGATCTCAGCATTGTGAATG-3' およびアンチセンス、5'-ACTGAGGGAGTTGCTTTTCTAC-3' を用いて、94℃で1分間の変性、60℃で2分間のアニール化、および72℃で2分間の伸長を含む。予期される増幅断片サイズは773bpであった。異なる試料間のRNAレベルを比較するために、RNA内部対照として β アクトチンを用いた (下の写真)。PCR産物は、1%アガロースゲルにおける電気泳動により分離した。

【図5】

健常者およびIgA腎症患者の糸球体内のメサングウム細胞における「MEGSIN」の発現を示すin situハイブリダイゼーション写真である。(A)はIgA-N患者の二つの糸球体の写真(40倍)である。細尿管及び間質領域には「MEGSIN」シグナルは観察されなかった。(B)は倍率80倍の写真である。IgA-N患者の糸球体間質領域に「MEGSIN」シグナルが観察される。(C)は倍率200倍の写真である。メサングウム細胞は「MEGSIN」陽性であるが、内皮細胞、ボーマン囊細胞は「MEGSIN」陰性であることが示されている。

【書類名】

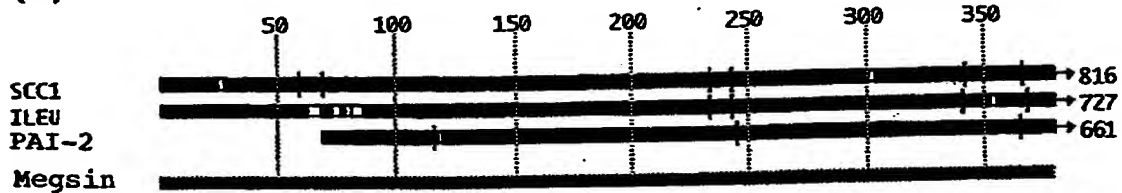
図面

【図1】

M	A	S	L	A	A	A	N	A	E	F	C	F	N	L	F	R	E	M	D	20
D	N	Q	G	N	G	N	V	F	F	S	S	L	S	L	F	A	A	L	A	40
L	V	R	L	G	A	Q	D	D	S	L	S	Q	I	D	K	L	L	H	V	60
N	T	A	S	G	Y	G	N	S	S	N	S	Q	S	G	L	Q	S	Q	L	80
K	R	V	F	S	D	I	N	A	S	H	R	D	Y	D	L	S	I	V	N	100
G	L	F	A	E	K	V	Y	G	F	H	K	D	Y	I	E	C	A	E	K	120
L	Y	D	A	K	V	E	R	V	D	F	T	N	H	L	E	D	T	R	H	140
N	I	N	K	W	V	E	N	E	T	H	G	K	I	K	N	V	I	G	E	160
G	G	I	S	S	A	V	M	V	L	V	N	A	V	Y	F	K	G	K	180	
W	Q	S	A	F	T	K	S	E	T	I	N	C	H	F	K	S	P	E	C	200
S	G	K	A	V	A	M	M	H	Q	E	R	K	F	N	L	S	V	I	E	220
D	P	S	M	K	I	L	E	L	R	Y	N	G	G	I	N	M	Y	V	L	240
L	P	E	N	D	L	S	E	I	E	N	K	L	T	F	Q	N	L	M	E	260
W	T	N	P	R	Q	M	T	S	K	Y	V	E	A	F	F	P	Q	F	K	280
I	E	K	N	Y	E	M	K	Q	Y	L	R	A	L	G	L	K	D	I	F	300
D	E	S	K	A	D	L	S	G	X	A	S	G	G	R	L	Y	I	S	R	320
M	M	H	K	S	Y	I	E	V	T	E	E	G	T	E	A	T	A	A	T	340
G	S	N	I	V	E	K	Q	L	P	Q	S	T	L	F	R	A	D	H	P	360
F	L	F	V	I	R	K	D	D	I	I	L	F	S	G	K	V	S	C	P	380

【図2】

(A)

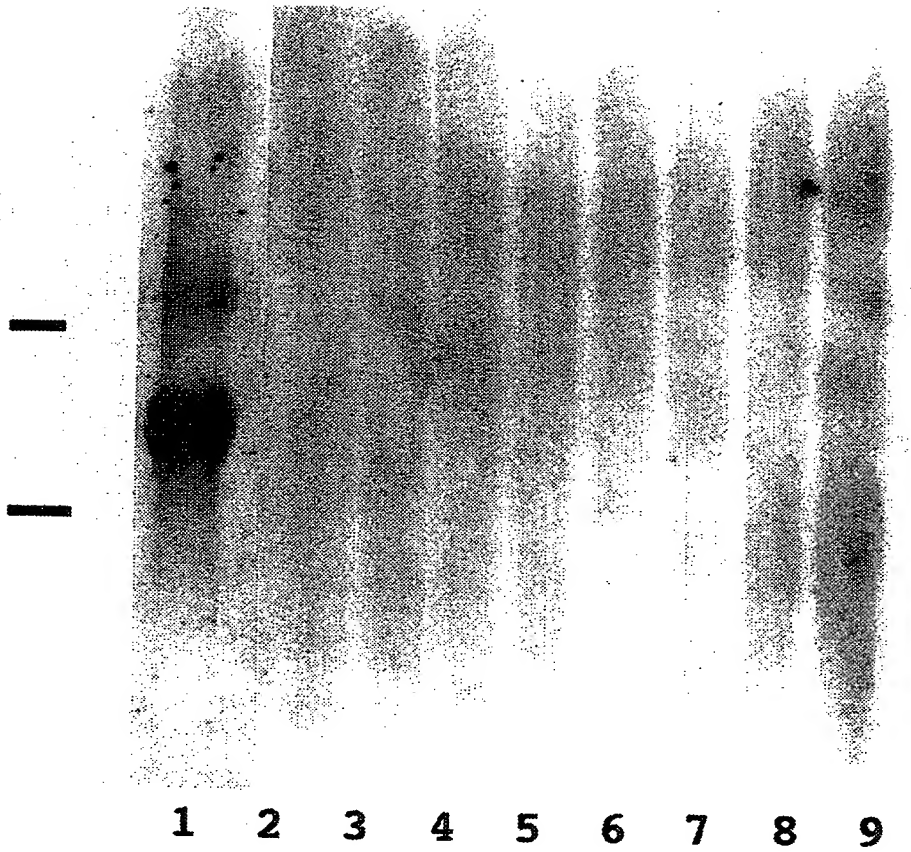


(B)

megsin	E E G T E A T A A T G S N I V E K Q L P Q
SCC1	E E G A E A A A A T A V V G F G S S P T S
ILEU	E E G T E A A A A T A G I A T F C M L M P
PAI-2	E E G T E A A A G T G G V M T G R T G H G
OVA	E A G R E V V G S A E A G V D A A S V S -

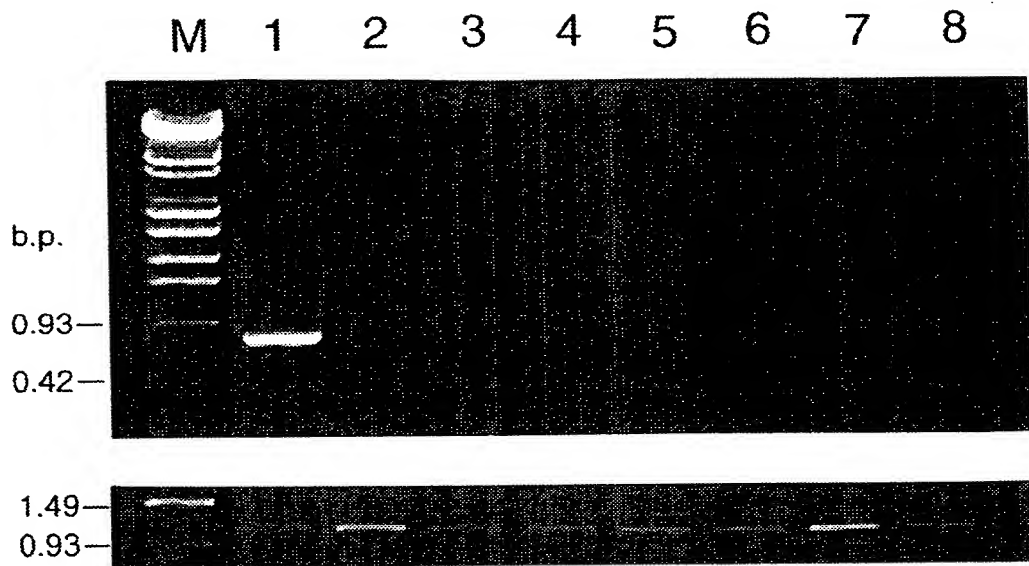
【図3】

図面代用写真



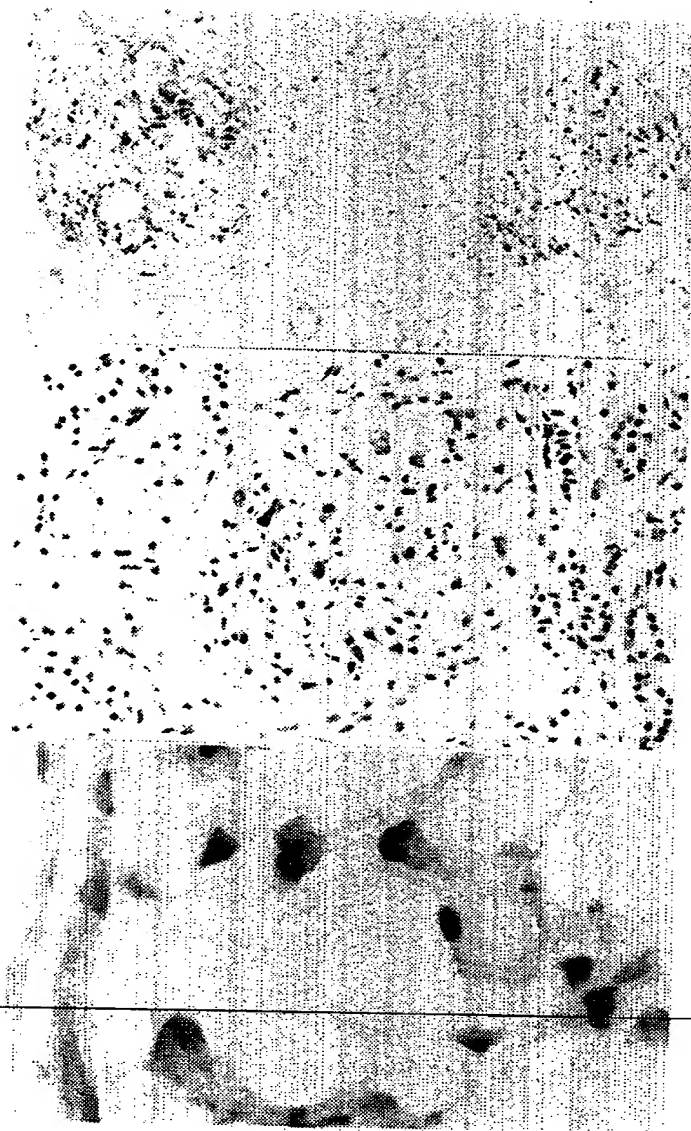
【図4】

図面代用写真



【図5】

図面代用写真



A

B

C

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 メサングウム細胞で特異的に発現される遺伝子を単離することを課題とする。

【解決手段】 メサングウム細胞に特異的に発現しているDNA、該DNAのコードするタンパク質、該タンパク質に結合する抗体等が提供された。これらはメサングウム細胞特有のものであり、メサングウム細胞の同定、メサングウム細胞の異常の検出などに有用である。更に、該タンパク質の機能からメサングウム細胞の機能が明らかになり、メサングウム細胞に関連する疾患の原因が究明され、ひいては、メサングウム細胞に関連する疾病の治療、診断等が可能となることが期待できる。


【選択図】 図1

委 任 状

平成 9 年 9 月 18 日

私は、識別番号 100102978 弁理士 清水 初志
識別番号 100108774 弁理士 橋本 一憲
を以て代理人として下記事項を委任します。

1. 特許出願、特許権の存続期間の延長登録の出願、実用新案登録出願、意匠登録出願、商標（防護標章）登録出願及び商標権（防護標章登録に基づく権利）存続期間更新登録出願に関する手続
1. 上記出願に基づく特許法第41条第1項または実用新案法第8条第1項の規定による優先権の主張及びその取下げ
1. 上記出願に関する出願の変更、出願の放棄及び出願の取下げ
1. 上記出願に関する拒絶査定に対する審判の請求
1. 上記出願に関する補正の却下の決定に対する審判の請求
1. 上記出願に係る特許権、実用新案権、意匠権、商標権又は防護標章登録に基づく権利及びこれらに関する権利に関する手続並びにこれらの権利の放棄
1. 上記出願に係る特許に対する特許異議の申立て又は商標（防護標章）登録に対する登録異議の申立てに関する手続
1. 上記出願に係る特許、特許権の存続期間の延長登録、意匠登録、商標登録、防護標章登録又は商標（防護標章）更新登録に対する無効審判の請求に関する手続
1. 上記出願に係る特許権に関する訂正の審判の請求
1. 上記出願に係る商標登録に対する取消しの審判の請求に関する手続
1. 上記各項の手続に関する請求の取下げ、申請の取下げ又は申立ての取下げ
1. 上記各項に関し行政不服審査法に基づく諸手続をなすこと
1. 国内優先権主張の先の出願である
に基づく特許法第41条第1項または実用新案法第8条第1項の優先権の主張及びその取下げ
1. 上記事項を処理するため、復代理人を選任及び解任すること

住所又は居所 東京都新宿区市谷柳町49市ヶ谷ビル401
氏名又は名称 黒川 清 
代表者

委任状

平成 9 年 9 月 18 日

私は、識別番号 100102978 弁理士 清水 初志
 識別番号 100108774 弁理士 橋本 一憲
 を以て代理人として下記事項を委任します。

1. 特許出願、特許権の存続期間の延長登録の出願、実用新案登録出願、意匠登録出願、商標（防護標章）登録出願及び商標権（防護標章登録に基づく権利）存続期間更新登録出願に関する手続
 1. 上記出願に基づく特許法第41条第1項または実用新案法第8条第1項の規定による優先権の主張及びその取下げ
 1. 上記出願に関する出願の変更、出願の放棄及び出願の取下げ
 1. 上記出願に関する拒絶査定に対する審判の請求
 1. 上記出願に関する補正の却下の決定に対する審判の請求
 1. 上記出願に係る特許権、実用新案権、意匠権、商標権又は防護標章登録に基づく権利及びこれらに関する権利に関する手続並びにこれらの権利の放棄
 1. 上記出願に係る特許に対する特許異議の申立て又は商標（防護標章）登録に対する登録異議の申立てに関する手続
 1. 上記出願に係る特許、特許権の存続期間の延長登録、意匠登録、商標登録、防護標章登録又は商標（防護標章）更新登録に対する無効審判の請求に関する手続
 1. 上記出願に係る特許権に関する訂正の審判の請求
 1. 上記出願に係る商標登録に対する取消しの審判の請求に関する手続
 1. 上記各項の手続に関する請求の取下げ、申請の取下げ又は申立ての取下げ
1. 上記各項に関し行政不服審査法に基づく諸手続をなすこと
 1. 国内優先権主張の先の出願である
 - に基づく特許法第41条第1項または実用新案法第8条第1項の優先権の主張及びその取下げ
1. 上記事項を処理するため、復代理人を選任及び解任すること

住所又は居所 神奈川県小田原市城山3-3-1

氏名又は名称 宮田 敏男 (印)

代表者



書式 7

受 託 証

通知番号 : 9 生寄文 第 1334号

通知年月日: 平成 9 年 9 月 22 日

宮田 敏男

殿

工業技術院生命工学工業技術研究所

大 著 信



1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) Escherichia coli pMAL-MEGSIN	(受託番号) FERM P- 16439
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <div style="text-align: center;"> <input type="checkbox"/> 科学的性質 <input type="checkbox"/> 分類学上の位置 </div>	
3. 受領及び受託	
当所は、平成 9 年 9 月 22 日に受領した1欄の微生物を受託する。	



表式 7

受 託 証

通知番号 : 9 生寄文 第 1335号

通知年月日: 平成 9 年 9 月 22 日

宮田 敏男

殿

工業技術院生命工学工業技術院

大審 信



1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) Escherichia coli pCR-942 CD-11/2	(受託番号) FERM P- 16440
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <div style="display: flex; justify-content: center; gap: 40px;"> <div><input type="checkbox"/> 科学的性質</div> <div><input type="checkbox"/> 分類学上の位置</div> </div>	
3. 受領及び受託	
当所は、平成 9 年 9 月 22 日に受領した1欄の微生物を受託する。	

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 597142376
【住所又は居所】 神奈川県小田原市城山3-3-1
【氏名又は名称】 宮田 敏男

【特許出願人】

【識別番号】 597142387
【住所又は居所】 東京都新宿区市谷柳町49市ヶ谷ヒルズ401
【氏名又は名称】 黒川 清

【代理人】

申請人

【識別番号】 100102978
【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階
清水国際特許事務所
【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774
【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階
清水国際特許事務所
【氏名又は名称】 橋本 一憲

【提出された物件の記事】

【提出物件名】 委任状（代理権を証明する書面） 2
受託証 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [597142376]

1. 変更年月日 1997年 9月22日
[変更理由] 新規登録
住 所 神奈川県小田原市城山3-3-1
氏 名 宮田 敏男

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [597142387]

1. 変更年月日 1997年 9月22日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都新宿区市谷柳町49市ヶ谷ヒルズ401

氏 名 黒川 清

